

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 18 May 2001 (18.05.01)	
International application No. PCT/JP00/05943	Applicant's or agent's file reference F1000308WO00
International filing date (day/month/year) 31 August 2000 (31.08.00)	Priority date (day/month/year) 16 September 1999 (16.09.99)
Applicant INOUE, Takakazu	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
 11 April 2001 (11.04.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
 34, chemin des Colombettes
 1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740 14 35

Authorized officer

Kiwa Mpay

Telephone No. (41-22) 338 83 38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference F1000308WO00	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/05943	International filing date (day/month/year) 31 August 2000 (31.08.00)	Priority date (day/month/year) 16 September 1999 (16.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/68, C12M 1/00, 1/38, G01N 33/55		
Applicant SANYO ELECTRIC CO., LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 4 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 11 April 2001 (11.04.01)	Date of completion of this report 27 August 2001 (27.08.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/05943

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages 1-17,19, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages 18, filed with the letter of 09 August 2001 (09.08.2001)
- ☒ the claims:
pages 2-4,10-16, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages 1,5-9, filed with the letter of 09 August 2001 (09.08.2001)
- ☒ the drawings:
pages 1-8, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the sequence listing part of the description:
pages 1-5, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/05943

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	4-7,9-16	YES
	Claims	1-3,8	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-16	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: "Use of an arbitrarily primed PCR product in the development of a *Campylobacter jejuni*-specific PCR," (Day WA Dr., Peeper IL, et al.), Appl. Environ. Microbiol. (1997), Vol. 63, No. 3, pages 1019-1023

Document 2: "Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community," (Eichner CA, Erb RW, et al.), Appl. Environ. Microbiol. (January 1999), Vol. 65, No. 1, pages 102-109

Document 3: "A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis," (Schwieger F., Tebbe CC), Appl. Environ. Microbiol. (1998), Vol. 64, No. 12, pages 4870-4876

Document 4: "Detection of *Shigellae* from Stools of Dysentery Patients by Culture and Polymerase Chain Reaction Techniques," (M. S. IsLam, et al.), J. Diarrhoeal Dis Res (1998), Vol. 16, No. 4, pages 248-251

Document 5: JP, 11-127898, A (Yakult Bioscience Kenkyu Zaidan), 18 May, 1999 (18.05.99)

Document 6: JP, 11-123093, A (Yakult Honsha Co., Ltd., Yakult Bioscience Kenkyu Zaidan), 11 May, 1999 (11.05.99)

Document 7: JP, 11-151097, A (Yakult Honsha Co., Ltd.), 8 June, 1999 (08.06.99)

Claims 1-3 and 8

Documents 1 and 4-7 describe to the effect that the gene of an enterobacterium is isolated by means of hybridization using a probe, amplified by means of PCR and identified by means of electrophoresis.

Claims 1-16

Document 2 describes to the effect that the cellular flora of activated sludge is analyzed by means of gradient electrophoresis after amplifying 16S rDNA.

Documents 3-6 describe to the effect that a microbial flora is separately analyzed by means of electrophoresis after amplifying 16S rRNA gene by means of PCR, and document 5 describes the use of a primer as a probe.

"Arranging a probe at a specific position," "Using an intended gene amplified by means of a primer, as a probe," "Controlling reaction temperature when a gene is amplified by means of PCR," "A method and device for detecting a hybridized gene when a probe is hybridized to a gene," "A method of arranging known base sequences as DNA chips on a substrate," and "A method and device for analyzing that a probe has been hybridized" are considered to be well-known techniques as of the priority date of the present application. So, a person skilled in the art could have easily conceived of applying said well-known techniques to the methods of identifying bacteria described in documents 1-6.

Furthermore, the effects of the subject matters of claims 1-16 of the present application are considered to be at the level that could be predicted by a person skilled in the art.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

is detected in this analyzing computer 50 for identifying the same.

In order to capture the hybridization state in the detector 45 as the light intensity of fluorescence, light emission or the like, the following techniques are preferably employed:

- (1) fluorescent dye modification of primer employing a primer modified with a dye on DNA,
- (2) dying DNA double chained by hybridization with double chain DNA dyeing reagent, ethidium bromide, SYBR Green (reagent by Nippon Gene),
- (3) usage of DIG (BOEHRINGER MANNHEIM) and ECL (Amersham Pharmacia)
- (4) usage of fluorescent plasmon resonance and mass change measurement with a quartz resonator

An analyzing method of the system 40 according to the fifth embodiment is now described with reference to a process diagram of Fig. 8.

Referring to Fig. 8, PCR is executed under the PCR reaction conditions shown in the second embodiment (S10). In this embodiment, three types of primers were employed (Pr1, Pr2 and Pr3).

Thereafter the electromagnetic valve 43 is adjusted so that the PCR reaction liquid injected into the tubes flows into the DNA denaturation part 44 (S11).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

In the DNA denaturation part 44, the temperature is raised to a prescribed temperature by the temperature control 47 to denature DNA (S12).

5 The denatured DNA is introduced into the Pr1 bacteria detection tube 45a, the Pr2 bacteria detection tube 45b and the Pr3 bacteria detection tube 45c communicating with each primer of the detector 45 through tubes (S13).

10 The temperature controller 47 sets the Pr1 bacteria detection tube 45a, the Pr2 bacteria detection tube 45b and the Pr3 bacteria detection tube 45c to a prescribed temperature, thereby rendering the denatured DNA in each detection tube readily hybridized (S14).

15 When employing fluorescent dye modification, ethidium bromide 42 is injected into the Pr1 bacteria detection tube 45a, the Pr2 bacteria detection tube 45b and the Pr3 bacteria detection tube 45c through the electromagnetic valve 43 (S15). Thus, when the probe carrier is irradiated with light from the light source 48, the denatured DNA fluoresces if hybridized, and the light intensity such as the degree of this fluorescence
20 can be acquired with the CCD camera 49 as image data (S16).

The obtained image data is transmitted to the analyzing computer 50 and compared with set data of the probe carrier 46, to identify (detect) (S17).

25 While the example employing a dye has been mentioned in the step S15, it is not restricted to this but another technique

THIS PAGE BLANK (USPTO)

capable of capturing the hybridization state of the detector 45 can be applied, and hence the processing of the step S15 may be omitted as the case may be.

When repetitively using the system 40, it is possible
5 to release the temporarily hybridized DNA by adjusting the electromagnetic valve 43 to feed the wash 41, e.g., a sodium hydroxide solution to the detector 45. Alternatively, it is possible to enhance release of the hybridized DNA also by controlling the temperature of the detector 45 by the
10 temperature controller 47.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

CLAIMS

1. A method for analyzing an intestinal bacterial flora of a subject, comprising:

5 a nucleic acid amplifying step of amplifying nucleic acid of an intestinal bacterial group in a sample extracted from the subject with a specific PCR primer; and

an analyzing step of analyzing the intestinal bacterial flora on the basis of an amplified fragment obtained in said
10 nucleic acid amplifying step.

2. The method for analyzing an intestinal bacterial flora according to claim 1, wherein said analyzing step includes a fractionating step of fractionating said amplified fragment
15 by electrophoresis and an analyzing step of analyzing a fractional pattern obtained in said fractionating step.

3. The method for analyzing an intestinal bacterial flora according to claim 1, wherein hybridization with said amplified
20 fragment is performed using a plurality of probes so that analysis of the intestinal bacterial flora is performed based upon presence/absence of formation thereof in said analyzing step.

25 4. The method for analyzing an intestinal bacterial flora

THIS PAGE BLANK (USPTO)

according to claim 3, wherein said probes are arranged on specific positions in a detector.

5. The method for analyzing an intestinal bacterial flora
5 according to claim 4, wherein nucleic acid amplified from each intestinal bacterium with the PCR primer employed in said nucleic acid amplifying step is used as a probe.

6. The method for analyzing an intestinal bacterial flora
10 according to claim 4, wherein the nucleic acid obtained in said nucleic acid amplifying step is denatured before introduction into said detector.

7. The method for analyzing an intestinal bacterial flora
15 according to claim 4, wherein a set temperature of said detector is arbitrarily changeable according to an instruction from a temperature controller.

8. The method for analyzing an intestinal flora according to
20 any of claims 1 to 7, wherein said specific PCR primer has a sequence capable of amplifying a nucleic acid region coding 16SrRNA of said intestinal bacterium.

9. The method for analyzing an intestinal bacterial flora
25 according to any of claims 1 to 7, wherein said specific primer

THIS PAGE BLANK (USPTO)

is a primer having a specific amplification probability.

10. An apparatus for analyzing an intestinal bacterial flora, comprising:

5 a nucleic acid amplifier that amplifies nucleic acid of an intestinal bacterial group in a sample extracted from a subject;

an electrophoretic unit that fractionates said amplified nucleic acid by electrophoresis; and

10 an analyzer that analyzes the intestinal bacterial flora from an electrophoretic pattern fractionated in said electrophoretic unit.

11. An apparatus for analyzing an intestinal bacterial flora, comprising:

15 a nucleic acid amplifier that amplifies nucleic acid of an intestinal bacterial group in a sample extracted from a subject;

20 a hybridizer that hybridizes said amplified nucleic acid and a specific probe; and

an analyzer that analyzes the intestinal bacterial flora from a result of said hybridization.

12. The apparatus for analyzing an intestinal bacterial flora according to claim 11, wherein said hybridizer includes a DNA

THIS PAGE BLANK (USPTO)

chip where a probe formed by nucleic acid derived from the intestinal bacterial group is arranged.

13. The apparatus for analyzing an intestinal bacterial flora according to claim 11, wherein said hybridizer includes a detector where a specific probe formed by nucleic acid derived from the intestinal bacterial group is arranged on a specific position.

14. The apparatus for analyzing an intestinal bacterial flora according to claim 13, wherein nucleic acid amplified from each intestinal bacterium with a PCR primer employed in said nucleic acid amplifier is used as a probe.

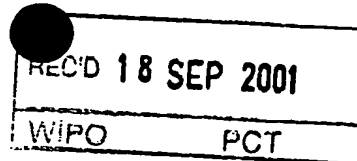
15. The apparatus for analyzing an intestinal bacterial flora according to claim 13, wherein a DNA denaturation part that denatures nucleic acid is provided on a front stage of said detector.

16. The apparatus for analyzing an intestinal bacterial flora according to claim 13, comprising a temperature controller capable of arbitrarily changing a set temperature of said detector.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

出願人又は代理人 の書類記号 F1000308WO00	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/05943	国際出願日 (日.月.年) 31.08.00	優先日 (日.月.年) 16.09.99
国際特許分類 (IPC) Int. Cl ⁷ C12Q1/68, C12M1/00, C12M1/38, G01N33/55		
出願人 (氏名又は名称) 三洋電機株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。
- ☒ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で 4 ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
 - II ☐ 優先権
 - III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
 - IV ☐ 発明の単一性の欠如
 - V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - VI ☐ ある種の引用文献
 - VII ☐ 国際出願の不備
 - VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 11.04.01	国際予備審査報告を作成した日 27.08.01	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 新見 浩一	4N 9839
電話番号 03-3581-1101 内線 3488		

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書 第 1-17, 19 ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 18 ページ、 09.08.01 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 請求の範囲 第 2-4, 10-16 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 1, 5-9 項、 09.08.01 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 図面 第 1-8 ~~ページ~~/図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 明細書の配列表の部分 第 1-5 ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	4-7, 9-16	有
	請求の範囲	1-3, 8	無
進歩性 (IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-16	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-16	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1: Day WA Dr., Peeper IL, et. al., Use of an arbitrarily primed PCR product in the development of a *Campylobacter jejuni*-specific PCR.,

Appl. Environ. Microbiol. (1997), Vol. 63, No. 3, p. 1019-1023

文献2: Eichner CA, Erb RW, et. al., Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community.,

Appl. Environ. Microbiol. (1999, Jan), Vol. 65, No. 1, p. 102-109

文献3: Schwieger F, Tebbe CC, A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis.,

Appl. Environ. Microbiol. (1998), Vol. 64, No. 12, p. 4870-4876

文献4: M. S. Islam, et. al., Detection of *Shigellae* from Stools of Dysentery Patients by Culture and polymerase Chain Reaction Techniques.,

J DIARRHOEAL DIS RES (1998), Vol. 16, No. 4, p. 248-251

文献5: JP 11-127898 A (財団法人ヤクルト・バイオサイエンス研究財団)
18.5月.1999 (18.05.99)

文献6: JP 11-123093 A (株式会社ヤクルト本社, 財団法人ヤクルト・バイオサイエンス研究財団) 11.5月.1999 (11.05.99)

文献7: JP 11-151097 A (株式会社ヤクルト本社) 8.6月.1999 (08.06.99)

【請求の範囲1-3, 8】

引用文献1, 4-7には、腸内細菌の遺伝子をプローブでハイブリダイズさせることにより、単離、PCRにより増幅し、電気泳動により同定する旨、記載されている。

【請求の範囲1-16】

引用文献2には、活性汚泥の細胞叢を16S rDNAを増幅させたのち、グラジエント電気泳動により分析する旨、記載されている。

引用文献3乃至6には、微生物叢を16S rRNA遺伝子をPCRにより増幅し、その後電気泳動により分離分析をする旨、記載され、引用文献5では、プライマーをプローブに用いる旨、記載されている。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V 欄の続き

“プローブを特定の位置に配置すること”、“プライマーで増幅した目的遺伝子をプローブとして用いること”、“PCRで遺伝子を増幅する際に反応温度を制御すること”、“遺伝子にプローブをハイブリダイズさせる際にハイブリダイズした遺伝子を検出する方法と装置”、“公知の塩基配列をDNAチップとして基板にそろえる方法”“プローブがハイブリダイズしたことを分析する方法、装置”は本願優先日当時、周知技術であったと認められることから、上記周知技術を引用文献1乃至6に記載される細菌の同定方法に適用することは、当業者が容易に想到しうるものであると認められる。

また、本願特許請求の範囲1乃至16に係わる発明の効果も当業者が予測しうる程度のものであると認められる。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

検出部 4 5 でのハイブリッド形成状態を蛍光、発光等の光強度として捉えるには次の手法を用いることが好ましい。

(1) プライマーの蛍光色素修飾

DNA に色素を修飾したプライマーを使用する、

5 (2) 2 本鎖 DNA 染色試薬エチジウムブロマイド、SYBR Green (日本ジーン試薬) によるハイブリダイズにより 2 本鎖となった DNA を染色する、

(3) DIG (BOEHRINGER MANNHEIM 社)、ECL (Amersham Pharmacia 社) の使用

(4) 表面プラズモン共鳴法、水晶振動子による質量変化測定法の使用

10

次に、第五の実施形態におけるシステム 4 0 の分析方法を図 8 の処理工程図に従って説明する。

図 8 において、第二の実施形態で示した PCR 反応条件の下で PCR を実行する (S 1 0)。本実施形態では、3 種類のプライマー (Pr1、Pr2、Pr3) を用いた

15

この後、電磁弁 4 3 を調整して、チューブ内に注入した PCR 反応液が DNA 変性部 4 4 に流入するようにする (S 1 1)。

DNA 変性部 4 4 では、温度コントロール 4 7 によって所定温度まで昇温せしめて、DNA を変性させる (S 1 2)。

20

変性された DNA はチューブを介して検出部 4 5 の各プライマーに連通する、Pr1 用細菌検出管 4 5 a、Pr2 用細菌検出管 4 5 b、及び Pr3 用細菌検出管 4 5 c に導入される (S 1 3)。

25

温度制御部 4 7 は、Pr1 用細菌検出管 4 5 a、Pr2 用細菌検出管 4 5 b、及び Pr3 用細菌検出管 4 5 c を所定温度に設定することによって、各検出管内の変性された DNA をハイブリダイゼーションし易くする (S 1 4)。

ここで、蛍光色素修飾を用いる場合には、エチジウムブロマイド 4 2 を電磁弁 4 3 を介して Pr1 用細菌検出管 4 5 a、Pr2 用細菌検出管 4 5 b、及び Pr3 用細菌検出管 4 5 c に注入する (S 1 5)。これによって、ハイブリダイゼーションされていると、光源 4 8 からプローブ担持体に光を照射すると蛍光し、この蛍光

THIS PAGE BLANK (USPTO)

請 求 の 範 囲

1. (補正後) 被験者の腸内細菌叢を分析する方法であって、

5 被験者から採取した試料中の腸内細菌群の核酸を特定のPCRプライマーを用いて増幅させる核酸増幅工程と、

前記核酸増幅工程において得られた増幅断片に基づき腸内細菌叢を分析する分析工程とを含み、

前記特定のプライマーが特定の増幅確率を有するプライマーである腸内細菌叢の分析方法。

10

2. 前記分析工程には、前記増幅断片を電気泳動で分画する分画工程と、前記分画工程において得られた分画パターンを分析する分析工程とを含む請求項1に記載の腸内細菌叢の分析方法。

15 3. 前記分析工程には、複数のプローブを用いて前記増幅断片とハイブリッド形成を行わせ、その形成の有無から腸内細菌叢の分析が行われる請求項1に記載の腸内細菌叢の分析方法。

20 4. 前記プローブは、検出部中の特定の位置に配置されている請求項3に記載の腸内細菌叢の分析方法。

5. (補正後) 被験者の腸内細菌叢を分析する方法であって、

被験者から採取した試料中の腸内細菌群の核酸を特定のPCRプライマーを用いて増幅させる核酸増幅工程と、

25 前記核酸増幅工程において得られた増幅断片に基づき腸内細菌叢を分析する分析工程とを含み、

前記分析工程には、複数のプローブを用いて前記増幅断片とハイブリッド形成を行わせ、その形成の有無から腸内細菌叢の分析が行われ、

前記プローブは、検出部中の特定の位置に配置されている腸内細菌叢の分析方

THIS PAGE BLANK (USPTO)

法。

6. (補正後) 前記核酸増幅工程で用いたPCRプライマーで各腸内細菌から増幅された核酸をプローブとする請求項4または5に記載の腸内細菌叢の分析方

5 法。

7. (補正後) 前記核酸増幅工程において得られた核酸は、前記検出部への導入前に変性せしめる請求項4または5に記載の腸内細菌叢の分析方法。

10 8. (補正後) 前記検出部の設定温度は、温度制御部からの命令により任意に変更できる請求項4または5に記載の腸内細菌叢の分析方法。

9. (補正後) 前記特定のPCRプライマーが、前記腸内細菌の16S rRNAをコードした核酸領域を増幅し得る配列を有している請求項5～8のいずれかに記載の腸内細菌叢の分析方法。

15

10. 腸内細菌叢を分析するための装置であって、

被験者から採取した試料中の腸内細菌群の核酸を増幅させる核酸増幅部と、

前記増幅された核酸を電気泳動により分画する電気泳動部と、

20 前記電気泳動部において分画された泳動パターンから腸内細菌叢を解析する解析部とを有する腸内細菌叢の分析装置。

11. 腸内細菌叢を分析するための装置であって、

被験者から採取した試料中の腸内細菌群の核酸を増幅させる核酸増幅部と、

25 前記増幅された核酸と特定のプローブとをハイブリッド形成させるハイブリッド形成部と、

前記ハイブリッド形成の結果から腸内細菌叢を解析する解析部とを有する腸内細菌叢の分析装置。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

12. 前記ハイブリッド形成部には、腸内細菌群由来の核酸からなるプローブが配列されたDNAチップが備えられている請求項11に記載の腸内細菌叢の分析装置。

5 13. 前記ハイブリッド形成部には、腸内細菌群由来の核酸からなる特定のプローブが特定の位置に配置された検出部が備えられている請求項11に記載の腸内細菌叢の分析装置。

10 14. 前記核酸増幅部で用いたPCRプライマーで各腸内細菌から増幅された核酸をプローブとする請求項13に記載の腸内細菌叢の分析装置。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 F1000308W000	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/05943	国際出願日 (日.月.年) 31.08.00	優先日 (日.月.年) 16.09.99
出願人(氏名又は名称) 三洋電機株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 1 図とする。 ☒ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q1/68, C12M1/00, C12M1/38, G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q1/68, C12M1/00, C12M1/38, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Day WA Dr., Pepper IL, et. al., "Use of an arbitrarily primed PCR product in the development of a Campylobacter jejuni-specific PCR." Appl Environ Microbiol (1997), Vol. 63, No. 3, p. 1019-1023	1 - 5 6 - 16
Y	Eichner CA, Erb RW, et. al., "Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community." Appl Environ Microbiol (1999, Jan), Vol. 65, No. 1, p. 102-109	1 - 16

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 11. 00

国際調査報告の発送日

05.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇



4 N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Schwieger F, Tebbe CC, “A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16s rRNA gene-based microbial community analysis.” Appl Environ Microbiol (1998), Vol. 64, No. 12, p. 4870-4876	1 - 16
<u>X</u> Y	M. S. Islam, et. al., “Detection of <i>Shigellae</i> from Stools of Dysentery Patients by Culture and Polymerase Chain Reaction Techniques ” J DIARRHOEAL DIS RES (1998), Vol. 16, No. 4, p. 248-251	<u>1 - 5</u> 6 - 16
<u>X</u> Y	JP, 11-127898, A (財団法人ヤクルト・バイオサイエンス研究財団) 18. 5月. 1999 (18. 05. 99) ファミリーなし	<u>1-5, 8</u> 6, 7, 9-16
<u>X</u> Y	JP, 11-123093, A (株式会社ヤクルト本社, 財団法人ヤクルト・バイオサイエ ンス研究財団) 11. 5月. 1999 (11. 05. 99) ファミリーなし	<u>1-5, 8</u> 6, 7, 9-16
<u>X</u> Y	JP, 11-151097, A (株式会社ヤクルト本社) 8. 6月. 1999 (08. 06. 99) ファミリーなし	<u>1-5, 8</u> 6, 7, 9-16
A	JP, 11-127899, A (財団法人ヤクルト・バイオサイエンス研究財団) 18. 5月. 1999 (18. 05. 99) ファミリーなし	1 - 16

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2001年3月22日 (22.03.2001)

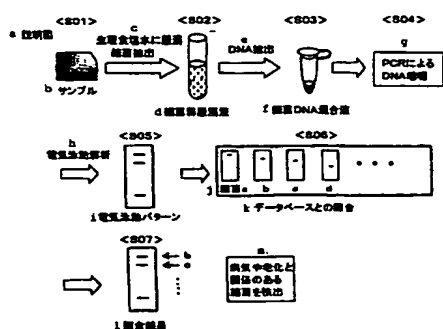
PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/20032 A1

- (51) 国際特許分類: C12Q 1/68, (72) 発明者: および
C12M 1/00, 1/38, G01N 33/50 (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 井上高一 (INOUE, Takakazu) [JP/JP]; 〒570-8677 大阪府守口市京阪本通2丁目5番5号 三洋電機株式会社内 Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/05943
- (22) 国際出願日: 2000年8月31日 (31.08.2000) (74) 代理人: 福島祥人, 外(FUKUSHIMA, Yoshito et al.); 〒564-0063 大阪府吹田市江坂町1丁目23番5号 大同生命江坂第2ビル8階 Osaka (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (81) 指定国(国内): US.
- (30) 優先権データ: (84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
特願平11/262590 1999年9月16日 (16.09.1999) JP
特願平11/330924 1999年11月22日 (22.11.1999) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 三洋電機株式会社 (SANYO ELECTRIC CO., LTD.) [JP/JP]; 〒570-8677 大阪府守口市京阪本通2丁目5番5号 Osaka (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF ANALYZING INTESTINAL FLORA AND ANALYTICAL APPARATUS

(54) 発明の名称: 腸内細菌叢の分析方法及び分析装置



- a...FLOW CHART
b...SAMPLE
c...SUSPENDING IN PHYSIOLOGICAL SALINE, EXTRACTING BACTERIA
d...SUSPENSION OF BACTERIA
e...EXTRACTING DNA
f...BACTERIA/DNA MIXTURE
g...AMPLIFYING DNA BY PCR
h...ANALYZING BY ELECTROPHORESIS
i...ELECTROPHORETIC PATTERN
j...BACTERIUM A
k...COMPARING WITH DATA BASE
l...RESULT OF COMPARISON
m...DETECTING BACTERIA RELATING TO DISEASE OR AGING

(57) Abstract: A method of analyzing intestinal flora which comprises: collecting a sample from a subject; extracting bacteria to give a suspension of the bacteria; extracting bacterial DNAs from the suspension to give a DNA extract; using the DNA extract in amplifying a specific domain such as 16SrDNA; fractionating the thus amplified fragments by electrophoresis to give a fractionation pattern; and comparing the fractionation pattern with preliminarily obtained electrophoretic patterns of amplified fragments of intestinal flora, thereby analyzing the intestinal flora of the subject.



(57) 要約:

本発明の腸内細菌叢を分析する方法は、被験者から試料を採取して、細菌を抽出して細菌懸濁液を調製する。細菌懸濁液から細菌のDNAを抽出してDNA抽出液を調製する。このDNA抽出液を用い、例えば、16S rDNAなどの特定の領域を増幅する。増幅された増幅断片を電気泳動により分画して分画パターンを得る。この分画パターンを予め測定された腸内細菌の増幅断片の泳動パターンと対比して、被験者の腸内細菌叢を分析する。

明 細 書

腸内細菌叢の分析方法及び分析装置

5

技術分野

本発明は、被験者の腸内細菌叢（腸内フローラ）を分析するための方法及び装置に関する。

10 背景技術

腸内には腸内細菌と呼ばれる常在細菌類が存在し、この細菌類の分布状態を腸内細菌叢という。腸内細菌には、Enterobacteriaceaeに属する大腸菌と近縁のSalmonella等、また、Bacteroides、Eubacterium、Bifidobacterium、Peptostreptococcus、Clostridium、Lactobacillusなどが含まれる。

15 これら腸内細菌は、食物の消化に補助的な役割を果たす他、外来の病原菌の発育を抑制するなどの体調の維持に役立っているが、このような腸内細菌叢は、各個体において一定ではなく、宿主の年齢、食物習慣などにより変化する。また、同一の個体においても、疾病や精神的なストレスなどによって変化することが知られている。

20 こうした腸内細菌叢を分析する場合に、従来は、培養法が利用されてきた。すなわち、被験者の糞便などの試料を選択培地又は非選択培地などに植菌し、各細菌の生育条件に合わせて、各培地を培養し、成長した細菌を染色等により細菌の性質に基づいて各腸内細菌が同定されていた。

しかし、腸内細菌群は100種類にも及ぶといわれており（「腸内フローラと
25 プロバイオティクス（INTESTINAL FLORA AND PROBIOTICS）」, Proceedings of V. Symposium of Intestinal Flora, Tokyo, 1996, 学会出版センター）、これら多数の腸内細菌群を培養法により分析することが極めて困難であり、分析可能な細菌の範囲も限定されることになる。また、一定の細菌群の範囲については分析が可能であるとしても、多数の細菌を培養し同定するためには、時間と労力の係る作業

であった。

一方、細菌にも、それぞれの細菌の特質が記録された遺伝情報が、DNAとして染色体にコードされている。これら細菌の特性の違いは、この遺伝情報を司る染色体上の配列に反映され、細菌ごとに特徴的な配列が存在する。

- 5 一例として、細菌のリボソームRNAの16S rRNAサブユニットをコードした16S rDNAでは、細菌間で異なり、この配列の相違により細菌を同定することができることが示されている（Christineら、Appl. Environ. Microbiol. 65:102-109）。

10 発明の開示

本発明の目的は、腸内細菌間の核酸配列の相違を利用して、腸内細菌叢を分析することである。

- 本発明の一局面に従う、被験者の腸内細菌叢を分析する方法は、被験者から採取した試料中の腸内細菌群の核酸を特定のPCRプライマーを用いて増幅させる
15 核酸増幅工程と、核酸増幅工程において得られた増幅断片に基づき腸内細菌叢を分析する分析工程とを含む。

分析工程には、増幅断片を電気泳動で分画する分画工程と、分画工程において得られた分画パターンを分析する分析工程とを含んでもよい。

- 分析工程には、複数のプローブを用いて増幅断片とハイブリッド形成を行わせ
20 、その形成の有無から腸内細菌叢の分析が行われることを含んでもよい。

プローブは、検出部中の特定の位置に配置されてもよい。

核酸増幅工程で用いたPCRプライマーで各腸内細菌から増幅された核酸をプローブしてもよい。

- 核酸増幅工程において得られた核酸は、検出部への導入前に変性せしめてもよい。
25 い。

検出部の設定温度は、温度制御部からの命令により任意に変更できてもよい。

特定のPCRプライマーが、腸内細菌の16S rRNAをコードした核酸領域を増幅し得る配列を有していてもよい。

特定のプライマーが特定の増幅確率を有するプライマーであってもよい。

本発明の他の局面に従う、腸内細菌叢を分析するための装置は、被験者から採取した試料中の腸内細菌群の核酸を増幅させる核酸増幅部と、増幅された核酸を電気泳動により分画する電気泳動部と、電気泳動部において分画された泳動パターンから腸内細菌叢を解析する解析部とを有する。

- 5 本発明のさらに他の局面に従う、腸内細菌叢を分析するための装置は、被験者から採取した試料中の腸内細菌群の核酸を増幅させる核酸増幅部と、増幅された核酸と特定のプローブとをハイブリッド形成させるハイブリッド形成部と、ハイブリッド形成の結果から腸内細菌叢を解析する解析部とを有する。

10 ハイブリッド形成部には、腸内細菌群由来の核酸からなるプローブが配列されたDNAチップが備えられてもよい。

ハイブリッド形成部には、腸内細菌群由来の核酸からなる特定のプローブが特定の位置に配置された検出部が備えられてもよい。

核酸増幅部で用いたPCRプライマーで各腸内細菌から増幅された核酸をプローブとしてもよい。

- 15 検出部の前段には、核酸を変性せしめるDNA変性部を設けてもよい。

検出部の設定温度を任意に変更できる温度制御部を備えてもよい。

20 以上の通り、本発明によれば、腸内細菌群の染色体に基づいて、腸内細菌群を検出することとしていることから、従来のように腸内細菌毎に対応した培養を行うことなく、腸内細菌叢を分析することができる。従って、腸内細菌叢の分析が容易になり、これによって健康管理などを腸内細菌叢の変化等に基づいて行うことが可能となる。また、疾患、老化などの身体の状態に関与する腸内細菌の同定などにも利用することが可能となる。

25 本発明によれば、特定のPCRプライマーにより腸内細菌の核酸が増幅され、その増幅断片に基づいて遺伝学的手法から腸内細菌叢を分析するため、従来のような各腸内細菌の培養条件に対応させた煩雑な培養操作を行うことなく、同一の操作で複数の腸内細菌を検出することができる。

分析工程では、増幅断片を電気泳動で分画する分画工程と、分画工程において得られた分画パターンを分析する分析工程とを含めることができる。または、特定のプローブ群を用いて増幅断片とハイブリッド形成を行わせ、その形成の有無

から腸内細菌叢の分析を行うこともできる。

本発明によれば、16S rRNAをコードした核酸（以下、16S rDNAという）は細菌によって、わずかに異なることが知られていることから（Christineら、前掲）、このDNAを対象として増幅し、その増幅断片を分析することにより、腸内の細菌の分布状態（すなわち、腸内細菌叢）を調べることが可能となる。

本発明によれば、特定の増幅確率を有するプライマーを一種類又はそれ以上用いることにより、試料中の腸内細菌の核酸を簡便に増幅させることが可能となる。なお、特定の増幅確率とは、プライマーが鋳型核酸を任意に増幅し得るものであり、この場合の増幅される断片数が鋳型核酸の配列長に対してある程度特定されているものをいう。

本発明によれば、核酸増幅部において、特定のプライマーにより腸内細菌の核酸が増幅され、分画部で、増幅された核酸が分画され、この分画パターンに基づいて、解析部において腸内細菌叢の解析が行われる。従って、従来のような各腸内細菌の培養条件に対応させた煩雑な培養操作を行うことなく、腸内細菌の核酸に基づいて比較的短時間で腸内細菌叢を分析することが可能となる。

本発明によれば、電気泳動に代えてハイブリダイゼーションにより腸内細菌叢を解析し得るため、特異性を向上させ、また、ドットハイブリダイゼーションなどによれば、処理能力を向上させることができる。

DNAチップの基板上には、多数のプロープが集積されているため、多数のプロープを用いたハイブリッド形成解析を並行して行うことができ、さらなる処理能力の向上が図られる。

図面の簡単な説明

図1は、第一の実施形態の腸内細菌叢の分析方法の操作を模式的に示した図である。

図2は、第一の実施形態の腸内細菌叢の分析結果を模式的に示した図である。

図3は、第二の実施形態の腸内細菌叢の分析において、被験者の泳動パターンと、データベース中のパターンデータとの照合を模式的に示した図である。

図4は、第三の実施形態における腸内細菌叢の分析システムの構成図である。

図5は、第四の実施形態における腸内細菌叢の分析システムの構成図である。

図6は、第四の実施形態における他の腸内細菌叢の分析システムの構成図である。

5 図7は、第五の実施形態における腸内細菌叢の分析システムの構成図である。

図8は、第五の実施形態における腸内細菌叢の分析システムの処理工程図である。

発明を実施するための最良の形態

10 以下、本発明の好適な実施形態を図面を用いて説明する。

[第一の実施形態]

図1は、第一の実施形態の腸内細菌叢の分析方法の工程図を模式的に示す。

(1) 試料の調製

15 図1において、被験者から試料、例えば糞便を採取し(S01)、この試料を生理食塩水等に懸濁する。この懸濁液は、その後、フィルターなどに通されて、細菌以外の不要な細胞などの固体が除去され、細菌群懸濁液が調製される(S02)。

20 この細菌の分離回収に用いるフィルターは、細菌とそれ以外の個体とを分離し得るサイズのものであれば特に限定はない。また、好適には、このフィルターとして、径の異なる複数のフィルターを用い、粗い目のものから細かな目のフィルターを順次通すことにより、フィルターの目詰まりを低減させることができる。例えば、目の粗いフィルターとしてストマフィルター(グンゼ産業)を、目の細かいフィルターとしてポリプロピレンスクリーン80 μ m、45 μ m、25 μ m(MILLIPORE)、ミニザルト5 μ m(sartorius)などのメン
25 ブランフィルターを組み合わせ好適に利用することもできる。

(2) 特定DNAのPCRによる増幅

前記分離された細菌は、細菌懸濁液として回収され、これを用いてDNA抽出が行われる(S03)。このDNA抽出は、例えば、current protocol in molecular biology, p2. 4. 1-2. 4. 5 (Green Publishing Associates and Wiley-Interscen

e, New York)に従って実施し、最終的に緩衝液（例えばT r i s - H C l 緩衝液など）に懸濁されて、この核酸懸濁液が調製される。

より具体的には、細菌懸濁液を例えばマイクロチューブなどに注入し、遠心する。遠心後、上清を除き、得られたペレットをS D S 及びプロテイナーースK含有
5 T E バッファ等に再懸濁する。再懸濁液を37℃で1時間インキュベートして溶菌させる。インキュベート後、懸濁液に5 M 塩化ナトリウム溶液を添加し、混合する。混合後、C T A B (hexadecyltrimethyl ammonium bromide) / 塩化ナトリウム溶液を添加して、65℃、1.0分間インキュベートする。

クロロホルム/イソアミルアルコール溶液を同量添加後、5分間遠心し菌体を
10 沈殿させる。得られた上清を別のチューブなどに移し、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールを添加し、遠心して、上清を回収して除蛋白処理を行う。

回収した上清は、さらに別のチューブに移し、イソプロパノールを添加して、核酸を沈殿させる。沈殿した核酸を70%エタノールで洗浄し、上清を除去して
15 、沈さを軽く乾燥させる。この沈さをT E バッファで再懸濁して核酸懸濁液とする。

調製された核酸懸濁液を用いてP C R が実施される（S 0 4）。このP C R において増幅させる核酸としては、細菌間で配列が相違し、その配列に基づいて細菌を識別し得る領域、例えば、細菌の16 S r D N A などを挙げることができる
20 。

この16 S r D N A は、細菌間でわずかに配列が相違し、また、配列に基づいた系統樹なども作られていることから（C h r i s t i n e ら、前掲）、この16 S r D N A に基づけば、後の分析工程において、細菌の特定をも行うことが可能となる。

従って、ここで用いられるP C R プライマーは、前記において選択された特定領域を増幅し得るものであればよく、例えば、前記16 S r R N A を増幅し得る
25 プライマーとしては、配列番号1と2とのプライマー対又は配列番号1と3とのプライマー対が好適に用いることができる。また、配列番号4及び5のプライマー対も、16 S r R N A を増幅し得るプライマーとして好適に用いることができ

る (Microbes and Environments 12: 57-68)。さらに、配列番号 6 及び 7 のプライマー対を用いてもよい。(「腸内フローラと腸内増殖」, Proceedings of 3rd Symposium on Intestinal Flora, Tokyo, 1994, 学会出版センター)。

また、PCR 反応液は、例えば、前記 Christine ら (前掲) に従って調製することができる。具体的には、前記核酸懸濁液の一部に、PCR 用のバッファを添加し、また、最終濃度、3 mM 塩化マグネシウム、5 % DMSO、各 0.1 mM dNTP、0.5 U Taq 酵素となるように各酵素を添加して反応液を調製する。

PCR の反応条件は、例えば、94℃で7分間保温することにより、鋳型 DNA を十分に変性させ、その後、変性工程 (94℃、1分間)、アニーリング工程 (54℃、1分間)、伸長工程 (72℃、1分間) の3工程を35サイクル繰り返し、最終的に10分間、72℃に保温して伸長工程を実施する。

(3) 増幅断片の電気泳動による分画

前記 PCR 反応液の一部を用いて、電気泳動を実施し (S05)、増幅断片の分画を行う。この電気泳動は、通常のアクリルアミドゲル又はアガロースゲルを用いた電気泳動を採用してもよいが、前記 16S rDNA のようにわずかに塩基配列が異なった増幅断片が複数反応液中に含まれ、これら増幅断片を識別可能とする場合には、温度グラディエント電気泳動を利用することが好ましい。

このグラディエント電気泳動は、例えば、8 M 尿素、20 % ホルムアミドを含む 6 % アクリルアミドゲルを準備し、予め、ゲルに 39 ~ 52℃ の温度グラディエントを形成させておく。そして、このゲルに前記 PCR 反応液を載せ、39℃から52℃までの温度グラディエントが形成された状態で、100 V、17 時間泳動を行う。

最終的に、電気泳動後の泳動 (分画) パターンをエチジウムブロマイド染色などにより視角化して、コンピュータにより読み取らせ、この分画パターンに基づいて、次の腸内細菌叢の分析が行われる。

(4) 腸内細菌の分析

前記分画パターンの分析は、例えば、前記と同一の条件で各腸内細菌の 16S rDNA を分画し、その分画パターンをデータベースに記録する。そして、この

データベース上のデータと前記被験者の分画パターンと対比して（S 0 6）、腸内細菌叢に含まれる細菌の種類を直接同定することもできる（S 0 7）。この際、予め、病気や老化に関係のある細菌が同定されている場合には、その細菌の有無を判定してもよい。

- 5 または、各腸内細菌と増幅断片との関係が対応付けされていない場合には、定期的に測定された被験者の腸内細菌叢を示す分画パターンをデータベースに記録しておき、そのデータベース上の分画パターンと対比して、腸内細菌叢の変化を検出することもできる。そして、ここで検出された新たな増幅断片などに基づき、疾患や、不調時等に関連する腸内細菌を調べることもできる。

10 （５）応用

図 2 には、本腸内細菌叢の分析方法の応用例として、一人の被験者の健康状態を腸内細菌叢に基づきモニターする場合を示す。

- 15 上述した一連の操作により、被験者の腸内細菌叢を定期的に調べ、良好な健康状態における、腸内細菌群の 1 6 S r D N A 等の増幅断片の分画パターンを記録する。そして、被験者が身体において不調を感じるようになった場合にも、前記一連の操作により同様に腸内細菌群における 1 6 S r D N A の分画パターンを継続して調べる。この「不調時」分画パターンと前記「良好時」の分画パターンを比較し、不調時に生じるバンド又は消失するバンドの有無及びバンドの強度の変化等を判定する。

- 20 また、体調が回復している時期にも継続して腸内細菌叢の分析を行う。そして、不調時に生じているバンドが消失するか、良好時に特徴的なバンドが出現又は、バンド強度が高まるかなどがモニターされる。

- 25 例えば、図 2 を用いて説明すると、バンド e は不調時又は不調となる直前に出現し、また、バンド b は、不調となると出現し、この不調状態が継続するにつれてバンド強度が高くなることが示されている。また、「回復時」には、再びバンド e は消失し、これに変わって良好時に特徴的なバンド b が出現する。このように、体調変化に伴った腸内細菌群の特有の分画パターン変化を検知することにより、体調の変化を検知することが可能となる。

このように腸内細菌叢は、健康状態、ストレスなどにより変化すると考えられ

ていることから、この腸内細菌叢の分析は、血液検査などから検知することができない微妙な健康状態の変化を検知し得る手段として健康診断などに利用することが期待される。特に、腸内細菌叢はストレスなどの精神的な要因によっても変化することから、精神的な要因から生じる身体への影響を早期に検出することにも利用されることが期待される。

また、前記図 2 に示すような判定結果から健康状態を示す腸内細菌由来のバンドパターンを特定することができると共に、不調時に出現する増幅バンドから不調時に関連する腸内細菌を同定することもできる。また、このような腸内細菌の人体への影響などの研究などにもつなげることが可能となる。

さらには、図 2 に示す通り、この腸内細菌叢の分析方法は、薬剤などを投与した時に、その薬剤が与える腸内細菌叢への影響を調べる場合にも利用し得る。

[第二の実施形態]

前記第一の実施形態は腸内細菌の特定領域を指標に細菌群を検出し、細菌叢を分析する方法を示したが、本実施形態では、染色体の任意の領域を対象として、細菌群を検出し、腸内細菌叢を分析する方法を示す。

なお、第二の実施形態でも、被験者から採取した試料から細菌懸濁液を調製する点、調製された細菌懸濁液から核酸懸濁液を調製する点は同様であるため、ここではその説明を省略する。

(1) 腸内細菌群の任意領域の P C R 増幅

第二の実施形態では、染色体の任意の領域を対象として増幅断片を合成し、この合成された増幅断片に基づいて細菌群を検出する。このような種々の細菌の任意の領域を増幅し得るプライマーとしてランダム P C R のプライマーなどがあるが、一般のランダム P C R プライマーでは、非常に多くの増幅断片が合成され、電気泳動により分画した際に、バンド間が接近してパターンの読み取りが困難になる場合がある。そのため、ここでは、特定の増幅確率を有するプライマーを用い、腸内細菌群の任意の D N A 断片を増幅することとする。

この特定の増幅確率を有するプライマーは、前記所定の鋳型核酸の塩基長に対し限定された種類数の D N A 断片を増幅し得るプライマーを意味する。このように特定の増幅断片を合成し得るプライマーを用いることにより、その後の電気泳

動において分画パターンの読みとりを容易にすることができる。

具体的には、ここで用いることができるプライマーの増幅確率は特に限定はないが、増幅されたDNA断片を電気泳動により分画し精度よく解析し得るためには、増幅断片の数が25本以下であり、また、多数の腸内細菌群を効率よく解析
5 するためには、増幅断片の数は、少なくとも10程度とすることが好ましい。

一方、細菌の染色体長さは、 $8 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ bp であり (Molecular Biology of the Cell, third edition, p. 340)、腸内細菌群の染色体遺伝子を平均 5×10^6 bp と仮定する。また、腸内細菌はおおよそ100種類程度存在すると考えられていることから、腸内細菌群全体として塩基長は、 5×10^8 bp と仮定される。このような鑄型に対して、 5×10^7 bp 当たり1本の増幅断片を合成し得る
10 増幅確率を有するプライマーを用いれば、おおよそ10種類程度の増幅バンドが生成され、この増幅バンドが異なる細菌に由来すると10種類の細菌を調べることが可能となる。

従って、前記計算によれば、100種類の腸内細菌を調べるためには、例えば
15 5×10^{-7} の増幅確率を有するプライマーを少なくとも10種類用いる必要がある。さらに、細菌により塩基配列の偏りを考慮すれば、 5×10^{-7} の増幅確率を有するプライマーを50種類程度、より確実には100種類程度のプライマーを用いることが好ましい。

なお、このプライマーの増幅確率は一例であり、増幅確率を 5×10^{-7} に限定
20 されるものではない。従って、実験操作などにより所望の増幅確率を選択し、それに対応して、プライマーの種類を増減させることができる。

また、この増幅確率を求めるには、多数の種類の核酸が混在している溶液等、例えば、複数の腸内細菌由来の核酸が含有されている核酸懸濁液を鑄型として、種々のプライマーを用いて、それぞれのプライマーにおける増幅断片の生成数を
25 調査する。そして、この調査結果から各プライマーの増幅確率を求め、その中から所望の増幅確率を有するプライマーを選択する。この調査に用いることができるプライマーの候補としては、井上ら (「SSC-PCR法によるポピュレーションダイナミクスの研究」、第2回日本水環境学会シンポジウム講演集 (平成11年)、p 54~55、日本水環境学会) による5'-GGCTTCGAATCG-3' (配列番号

8)、5'-TGGATCTTTGAC-3' (配列番号9)、5'-AACATCTCCGGG-3' (配列番号10) など、また市販のプライマーとしては、DNAオリゴマー (ニッポンジーン社製) などを用いることができる。

(2) PCRの条件

5 PCR反応溶液の組成は、1×PCR用バッファ、1.5mM MgCl₂、200μM dNTPmix、2μMプライマー、0.0125ユニット/μL Taqポリメラーゼとすることができる。また、鋳型DNAは、前記第一の実施形態における核酸懸濁液を用いることができる。

10 また、PCR反応条件は、94℃1分、45℃2分、72℃3分とすることができる。この場合の反応サイクルは、例えば、35サイクルとすることができる。但し、この条件等は、例示であるため、この条件を変更することは可能である。

(3) DNA断片の増幅方法及び電気泳動による解析

15 例えば、マイクロタイタプレートの各ウェルに異なる増幅確率を有するプライマー、例えば 5×10^{-7} の増幅確率を有するプライマーを添加し、前記核酸懸濁液と混合する。そして、表1に示すようにPCRバッファ、塩化マグネシウム、dNTPミックス、Taqポリメラーゼを添加して、反応液を調製する。

【表1】

	最終濃度
バッファ	
Tris-HCl (pH8.3)	10mM
KCl	50mM
MgCl ₂	1.5mM
dNTPmix	200μM
プライマー	2μM
染色体DNA	10pg/μL
Taq DNAポリメラーゼ	0.025u/μL

20 反応液調製後、PCR増幅器にセットし、前述の反応条件でPCRを実行する。なお、この増幅器は、特に限定はなく、通常市販されている増幅器を使用することができる。

増幅反応終了後、反応液の一部が電気泳動にかけられ、増幅断片が分画される。この電気泳動の条件等は、解析するDNA断片の数や長さにより、適切なものが使用される。例えば、アガロースゲルを用いた電気泳動、ポリアクリルアミド

ゲル電気泳動などを用いることができる。また、分画するDNA断片の長さに幅がある場合には、ロングレンジ型ゲル及び装置を用いることができる。

電気泳動後、ゲルをエチジウムブロマイド染色等により増幅断片の分画パターンを視覚化し又はコンピュータなどにより読み取る。最終的に、この分画パターンに基づいて、次の被験者の通常の腸内細菌叢が分析される。

(4) 分画パターンに基づき腸内細菌叢の分析

腸内細菌叢の分析には、可能であれば、図3に示すように、前記分析に使用される同一のプライマーを用い同一のPCR条件で、各腸内細菌の染色体を増幅させ、その増幅断片の泳動パターンをデータベース1に記録したものを準備する。

このデータベース1中のパターンと、被験者の試料から得られ泳動パターン2とを照合して、細菌を同定し、腸内細菌叢を分析する。

または腸内細菌叢の分析には、図3に示すように各腸内細菌の分画パターンを記録したデータベースが準備できない場合にも、予め定期的に被験者の腸内細菌叢の状態を示す分画パターンを記録し保存しておくことが好ましい。そして、記録された腸内細菌群の分画パターンと対比し、健康状態が良好な時の分画パターンと一致するか、若しくは、良好な時の分画パターンとは一致せず、腸内細菌叢において変化が生じているかを分析し、健康状態をモニターすることもできる。

このように、本実施形態においても、この分析の結果、不調時に出現する特有の増幅バンドから、不調時に増殖又は減少し易い腸内細菌を同定してもよく、またこの第二の実施形態を用いて投薬時に与える腸内細菌群への状態を調べることもできる。

なお、上述した第一又は第二の実施形態では、増幅断片を電気泳動で分画し、その分画パターンから腸内細菌叢を分析する場合を説明したが、これ以外にハイブリダイゼーション法を用いてもよい。この場合、プローブには、腸内細菌群を分類等し得るプローブを用いることができる。例えば、第一の実施形態において各腸内細菌由来の16SrDNAの特徴的な領域を有するプローブ群を、また、第二の実施形態では、特定の増幅確率を有するプライマーにより増幅され得る断片に相補的な配列を有するプローブ群を用いることができる。そして、これらプローブ群と各増幅断片とハイブリダイゼーションを行い、ハイブリッド形成の

有無に基づいて、各増幅断片と腸内細菌の種類とを対応づけて腸内細菌叢を分析してもよい。

特にドットブロットハイブリダイゼーションによれば、処理能力を向上させることができ、また、後述するDNAチップを用いることにより、さらなる処理能力の向上が図られる。

これらドットブロットハイブリダイゼーション及びDNAチップを用いたハイブリッド形成解析では、特定のドット又は特定のチップ上の区画におけるハイブリッド形成の有無から腸内細菌叢を構成する細菌の種類を特定することができれば望ましいが、細菌の種類が特定することができない場合でも、DNAチップ等のハイブリッドの形成のパターン変化から腸内細菌叢の変化を検出してもよい。そして、この分析から、被験者の不調時等にシグナルが出現するドット又は区画上のプローブを用いて、「不調時」等に関連する腸内細菌等を特定してもよい。

[第三の実施形態]

本実施形態では、前記第一又は第二の実施形態の腸内細菌叢を分析方法を実行し得るシステム構成を図4を用いて説明する。

図4において、システム10には、被験者から採取した糞尿などの試料から細菌を抽出する細菌自動抽出部12が備えられている。この細菌自動抽出部12は、生理食塩水が収容され、この生理食塩水に試料を懸濁させる。また、この細菌自動抽出部12は、調製された懸濁液から細菌以外の固体を除去するために、内部にフィルタが備えられ、このフィルターにより、細菌のみを分離し、細菌懸濁液を調製する。細菌の回収時におけるフィルターの目詰まりを防止するために、このフィルターは、好ましくは目の粗いフィルターから目の細かいフィルターを備えることが好ましい。例えば、目の粗いフィルターとしてストマフィルター（グンゼ産業）を、目の細かいフィルターとしてポリプロピレンスクリーン80 μ m、45 μ m、25 μ m（MILLIPORE）、ミニザルト5 μ m（sartorius）などのメンブランフィルターを組み合わせ好適に利用することもできる。

前記細菌自動抽出部12には、この細菌自動抽出部12において調製された細菌懸濁液が移送される移送ライン13を介して、DNA自動抽出部14が接続さ

れている。このDNA自動抽出部14には、細菌からDNAを抽出するための試薬など備えられ、細菌からDNAが抽出され、DNA懸濁液が調製される。なお、このDNA自動抽出部は、市販されているDNA自動抽出器などを利用してよい。

5 前記DNA自動抽出部14には、調製されたDNA懸濁液を移送するための移送ライン15を介して、PCR反応部16が接続され、このPCR反応部16において、PCR反応液の調製及びPCR反応が実行される。そのため、このPCR反応部16には、腸内細菌叢を分析するためのPCRプライマーと、その他のPCR反応液を調製するための試薬（緩衝液、dNTP、ポリメラーゼ、塩化マグネシウムなどの塩類等）が収容され、移送ライン15を介して移送されたDNA懸濁液に、試薬が添加されてPCR反応液が調製される。このPCR反応液の調製後、操作者の所望の条件でPCR反応が実行される。

15 なお、このPCR反応部16におけるプライマーは、対象とする増幅領域に対応させて選択することができる。例えば、第一の実施形態に示したように、腸内細菌の特定領域として16SrDNAを増幅させる場合には、配列番号1、2のプライマー対、配列番号1、3のプライマー対又は配列番号4、5のプライマー対を選択することができる。また、腸内細菌の任意の領域を対象としてDNA増幅を行う場合には、第二の実施形態における所望の増幅確率を有するプライマーから用いることができる。

20 PCR反応部16には、電気泳動部18が接続され、この電気泳動部18では、PCR反応部16における反応液を電気泳動ゲル内で泳動させ、反応液中の増幅断片を分画する。なお、このPCR反応部16と電気泳動部18とは複数のキャピラリー17により接続することができる。そして、これらキャピラリー17の先端は、電気泳動部18における電気泳動ゲル（図示せず）の各レーンに接続させ、各PCR反応液がそれぞれ電気泳動ゲルの各レーンに注入されるように構成することができる。

25 前記電気泳動部18には、信号線19を介して解析用コンピュータ20が接続される。この解析用コンピュータ20では、電気泳動部18において分画された分画パターンを読み取り、ここで読みとられた分画パターンが解析される。

この分画パターンの解析のために、解析用コンピュータ 20 には、データベース 22 が接続されている。このデータベースには、例えば、各腸内細菌由来の 16 S r DNA などの特定領域に対する分画パターンデータ、第二の実施形態に示した特定の増幅確率を有するプライマーを用いた場合の各細菌の分画パターンデータ又は被験者の定期的な検査における分画パターンデータなどが記録される。

そして、これらデータベース上の分画パターンと電気泳動部 18 から得られた分画パターンとを解析用コンピュータ 20 において対比させ、腸内細菌叢の解析が行われ、腸内細菌の特定、腸内細菌叢に変化があるか、又は「良好時」もしくは「不調時」の腸内細菌叢と一致するか等が判定される。

最終的に判定された判定結果を表示等するために、解析用コンピュータ 20 には、表示部 24 に接続され、この表示部において判定結果の表示及び出力が行われる。

このように本システムでは、前記第一の実施形態又は第二の実施形態に示す腸内細菌叢の分析方法が実施され、被験者から採取された腸内細菌群の核酸に基づき、腸内細菌叢が分析される。従って、本システムでは、従来のような各腸内細菌に対応させて培養するような手間と、培養時間を削減することができる。

[第四の実施形態]

第四の実施形態では、腸内細菌叢を分析するための他のシステム 25 を示す。前記第三の実施形態のシステムでは、電気泳動部 18 を備え、増幅断片を電気泳動により分画していたが、この電気泳動による分画工程の代替として、図 5 に示すように、前記電気泳動部 18 に代えて、例えば、ハイブリッド解析部 26 を備えることもできる。

このハイブリッド解析部 26 には、例えば、DNA チップなどを備え、この DNA チップ等には、腸内細菌叢の分析に用いるプライマーにより増幅され得る各腸内細菌由来の DNA 領域、例えば、16 S r DNA 領域や、所望の増幅確率を有するプライマーにより増幅され得る DNA 領域が独立して固定される。そして、この DNA チップ等に、前記 PCR 反応部 16 において増幅された増幅断片を変性させた後、接触させて、ハイブリッド形成を行わせる。

なお、この DNA チップの作製等については、情報処理、vol 40 (199

0年3月), p 3 2 3 - 3 2 5に従って実施することができる。例えば、DNAチップの作製については、予め準備したプローブをチップ基板上に配置させるプローブ配置型、例えば、GEM array (Synteni社製) などでも、また、ガラスやシリコンなどの基板上で直接DNAの伸長反応を用いてプローブDNAを生成させたプローブ合成型、例えば、GeneChip (Affymetrix社製) でもよい。また、簡便には、市販のDNAチップ作製装置及びその読み取りには、DNAチップ読み取り装置 (例えば、GMS社製) 等を用いてもよい。

一方、このようにDNAチップを用いた場合には、データベース30にDNAチップ上の各腸内細菌の位置などを記録しておく。そして、解析用コンピュータ28において、データベース30中のデータに基づき、DNAチップ上のハイブリッドが形成された位置から腸内細菌群を特定し、腸内細菌叢が分析され、分析結果が表示部32に表示される。

または、ハイブリッド形成の有無から腸内細菌叢を構成する細菌の種類を特定することができない場合には、健康状態について「良好時」と「不調時」との間等におけるDNAチップ上でのハイブリッド形成のパターン変化に基づき、腸内細菌叢の変化を検出することもできる。そして、この分析結果から、被験者の不調時等においてハイブリッド形成が観察される区画上のプローブを用いて、「不調時」等に関連する腸内細菌等を特定してもよい。

このように電気泳動部に代えて、ハイブリッド解析部26を備え、ハイブリッドの形成の有無により、細菌を同定することが可能となれば、より操作が簡便になる。

また、細菌懸濁液から調製される核酸懸濁液が、DNAチップなどを用いて腸内細菌叢の分析に必要な量のDNAが含まれている場合には、図6に示すシステム34のように、前記PCR反応部を省略して、DNA自動抽出部14とハイブリッド解析部26とを直接接続してシステムを構成してもよい。

[第五の実施形態]

第五の実施形態では、腸内細菌叢を分析するための他のシステム40を示す。

第五の実施形態の腸内細菌叢の分析方法を実行し得るシステム構成を図7を用

いて説明する。

図 7 において、PCR 反応部 16 は、チューブを介して、電磁弁 43、DNA 変性部 44、及び検出部 45 に接続され、PCR 反応部 16 の反応液は最終的に 5 排出口からシステム 40 の外部に排出されるように構成されている。電磁弁 42 は PCR 反応部 16 と DNA 変性部 44 との間に設けられ、この電磁弁 43 の切り換えにより洗浄液 41、或いは色素（例えば、エチジウムブロマイド）を検出部 45（後述する。）に送出させることができる。

検出部 45 は、Pr1 用細菌検出管 45 a、Pr2 用細菌検出管 45 b、及び Pr3 用細菌検出管 45 c から構成されており、各検出管 45 a ~ 45 c のプローブ担持 10 体には腸内細菌叢の分析に用いるプライマーにより増幅され得る各腸内細菌由来の DNA 領域、例えば 16 S r DNA 領域や、所望の増幅確率を有するプライマーにより増幅され得る DNA 領域が独立して固定されている。

この DNA 領域のプローブ担持体への固定手法としては、

(1) プローブ担持体にフィルターを用いる手法

15 ニトロセルロース膜（フィルタ）からなるプローブ担持体を所定温度に加熱処理したり、またナイロンメンブランからなるプローブ担持体を紫外線照射する、

(2) 化学的結合手法

プローブ担持体とプローブをチオール分子等を介して結合する、

(3) ビオチン化手法

20 ビオチンを用いる、

等の種々の手法が確立されているが、本発明はこれらの手法に限定されるものではない。

温度制御部 47 は DNA 変性部 44、検出部 45 の温度を任意に設定できる。この温度制御により DNA 変性部 44 での DNA の変性割合、及び検出部 45 で 25 のハイブリッド形成状態の割合を制御することが可能になる。

光源 48 は検出部 45 に可視光、或いは紫外光を照射し、一方 CCD カメラ 49 は検出部 45 でのハイブリッド形成状態を蛍光、発光等の光強度として捉え、その光学的データを後段の解析用コンピュータ 50 に送出し、この解析用コンピュータ 50 で腸内細菌を検出することによって同定する。

検出部 4 5 でのハイブリッド形成状態を蛍光、発光等の光強度として捉えるには次の手法を用いることが好ましい。

(1) プライマーの蛍光色素修飾

DNA に色素を修飾したプライマーを使用する、

5 (2) 2 本鎖 DNA 染色試薬エチジウムブロマイド、SYBR Green (日本ジーン試薬) によるハイブリダイズにより 2 本鎖となった DNA を染色する、

(3) DIG (BOEHRINGER MANNHEIM 社)、ECL (Amersham Pharmacia 社) の使用

(4) 蛍光プラズモン共鳴法、水晶振動子による質量変化測定法の使用

10

次に、第五の実施形態におけるシステム 4 0 の分析方法を図 8 の処理工程図に従って説明する。

図 8 において、第二の実施形態で示した PCR 反応条件の下で PCR を実行する (S 1 0)。本実施形態では、3 種類のプライマー (Pr1、Pr2、Pr3) を用いた。

15

この後、電磁弁 4 3 を調整して、チューブ内に注入した PCR 反応液が DNA 変性部 4 4 に流入するようにする (S 1 1)。

DNA 変性部 4 4 では、温度コントロール 4 7 によって所定温度まで昇温せしめて、DNA を変性させる (S 1 2)。

20

変性された DNA はチューブを介して検出部 4 5 の各プライマーに連通する、Pr1 用細菌検出管 4 5 a、Pr2 用細菌検出管 4 5 b、及び Pr3 用細菌検出管 4 5 c に導入される (S 1 3)。

温度制御部 4 7 は、Pr1 用細菌検出管 4 5 a、Pr2 用細菌検出管 4 5 b、及び Pr3 用細菌検出管 4 5 c を所定温度に設定することによって、各検出管内の変性された DNA をハイブリダイゼーションし易くする (S 1 4)。

25

ここで、蛍光色素修飾を用いる場合には、エチジウムブロマイド 4 2 を電磁弁 4 3 を介して Pr1 用細菌検出管 4 5 a、Pr2 用細菌検出管 4 5 b、及び Pr3 用細菌検出管 4 5 c に注入する (S 1 5)。これによって、ハイブリダイゼーションされていると、光源 4 8 からプローブ担持体に光を照射すると蛍光し、この蛍光

度等の光強度を画像データとしてCCDカメラ49によって取得することができる(S16)。

得られた画像データは、解析用コンピュータ50に送出され、プローブ担持体46の設置データと比較され、細菌を同定(検出)する(S17)。

- 5 尚、ステップS15では、色素を用いる例を挙げたが、これには限られず、検出部45のハイブリッド形成状態を捉えることができる他の手法を適用することができるため、場合によってはステップS15の処理を割愛しても良い。

- 10 また、システム40を繰り返して使用する場合には、電磁弁43を調整することにより洗浄液41、例えば水酸化ナトリウム溶液を検出部45に送出することにより、一旦ハイブリッド形成されたDNAを解放することが可能である。この他、温度制御部47によって検出部45の温度を制御することによっても更にハイブリッドされたDNAの解放を促進させることが可能となる。

請 求 の 範 囲

1. 被験者の腸内細菌叢を分析する方法であって、
被験者から採取した試料中の腸内細菌群の核酸を特定のP C Rプライマーを用
5 いて増幅させる核酸増幅工程と、
前記核酸増幅工程において得られた増幅断片に基づき腸内細菌叢を分析する分
析工程とを含む腸内細菌叢の分析方法。
2. 前記分析工程には、前記増幅断片を電気泳動で分画する分画工程と、前記分
10 画工程において得られた分画パターンを分析する分析工程とを含む請求項1に記
載の腸内細菌叢の分析方法。
3. 前記分析工程には、複数のプローブを用いて前記増幅断片とハイブリッド形
成を行わせ、その形成の有無から腸内細菌叢の分析が行われる請求項1に記載の
15 腸内細菌叢の分析方法。
4. 前記プローブは、検出部中の特定の位置に配置されている請求項3に記載の
腸内細菌叢の分析方法。
- 20 5. 前記核酸増幅工程で用いたP C Rプライマーで各腸内細菌から増幅された核
酸をプローブとする請求項4に記載の腸内細菌叢の分析方法。
6. 前記核酸増幅工程において得られた核酸は、前記検出部への導入前に変性せ
しめる請求項4に記載の腸内細菌叢の分析方法。
- 25 7. 前記検出部の設定温度は、温度制御部からの命令により任意に変更できる請
求項4に記載の腸内細菌叢の分析方法。
8. 前記特定のP C Rプライマーが、前記腸内細菌の16 S r R N Aをコードし

た核酸領域を増幅し得る配列を有している請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の腸内細菌叢の分析方法。

9. 前記特定のプライマーが特定の増幅確率を有するプライマーである請求項 1
5 ～ 7 のいずれかに記載の腸内細菌叢の分析方法。

10. 腸内細菌叢を分析するための装置であって、
被験者から採取した試料中の腸内細菌群の核酸を増幅させる核酸増幅部と、
前記増幅された核酸を電気泳動により分画する電気泳動部と、
10 前記電気泳動部において分画された泳動パターンから腸内細菌叢を解析する解析部とを有する腸内細菌叢の分析装置。

11. 腸内細菌叢を分析するための装置であって、
被験者から採取した試料中の腸内細菌群の核酸を増幅させる核酸増幅部と、
15 前記増幅された核酸と特定のプローブとをハイブリッド形成させるハイブリッド形成部と、
前記ハイブリッド形成の結果から腸内細菌叢を解析する解析部とを有する腸内細菌叢の分析装置。

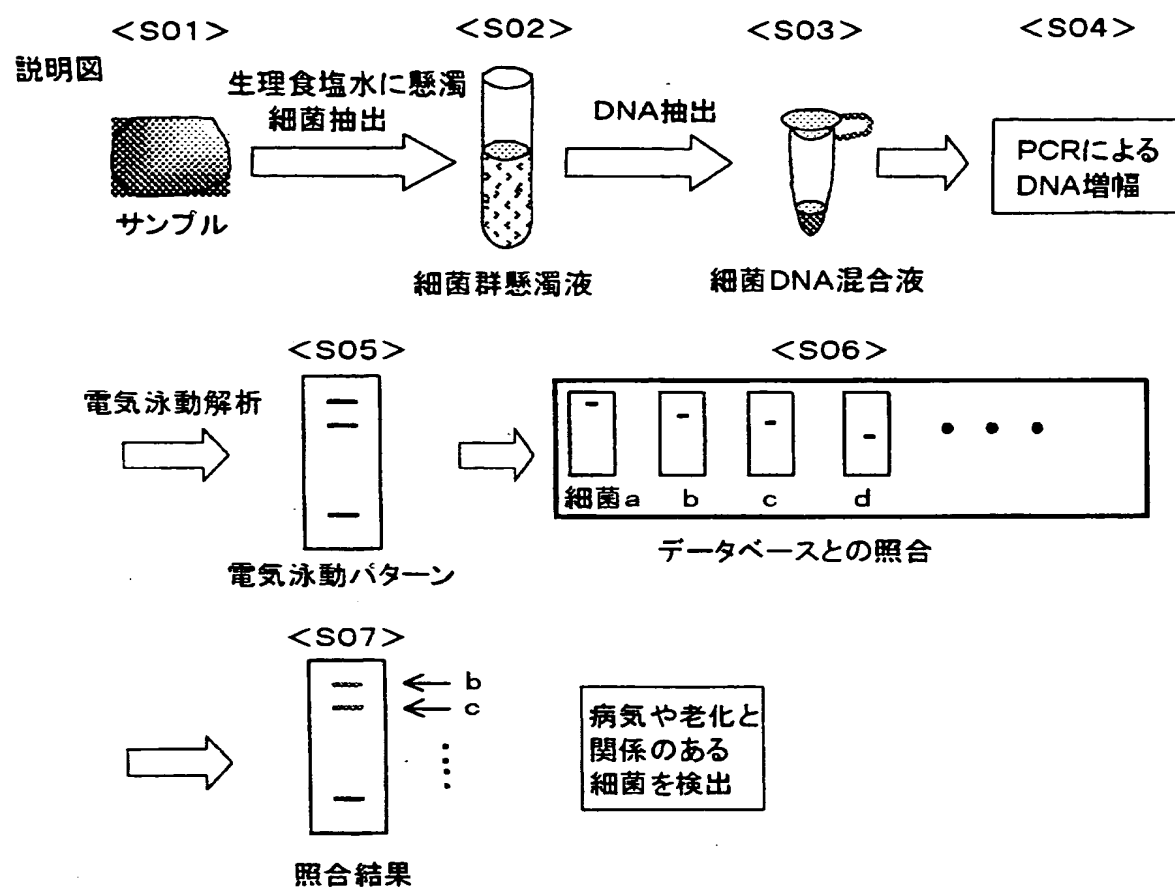
20 12. 前記ハイブリッド形成部には、腸内細菌群由来の核酸からなるプローブが配列された DNA チップが備えられている請求項 11 に記載の腸内細菌叢の分析装置。

25 13. 前記ハイブリッド形成部には、腸内細菌群由来の核酸からなる特定のプローブが特定の位置に配置された検出部が備えられている請求項 11 に記載の腸内細菌叢の分析装置。

14. 前記核酸増幅部で用いた PCR プライマーで各腸内細菌から増幅された核酸をプローブとする請求項 13 に記載の腸内細菌叢の分析装置。

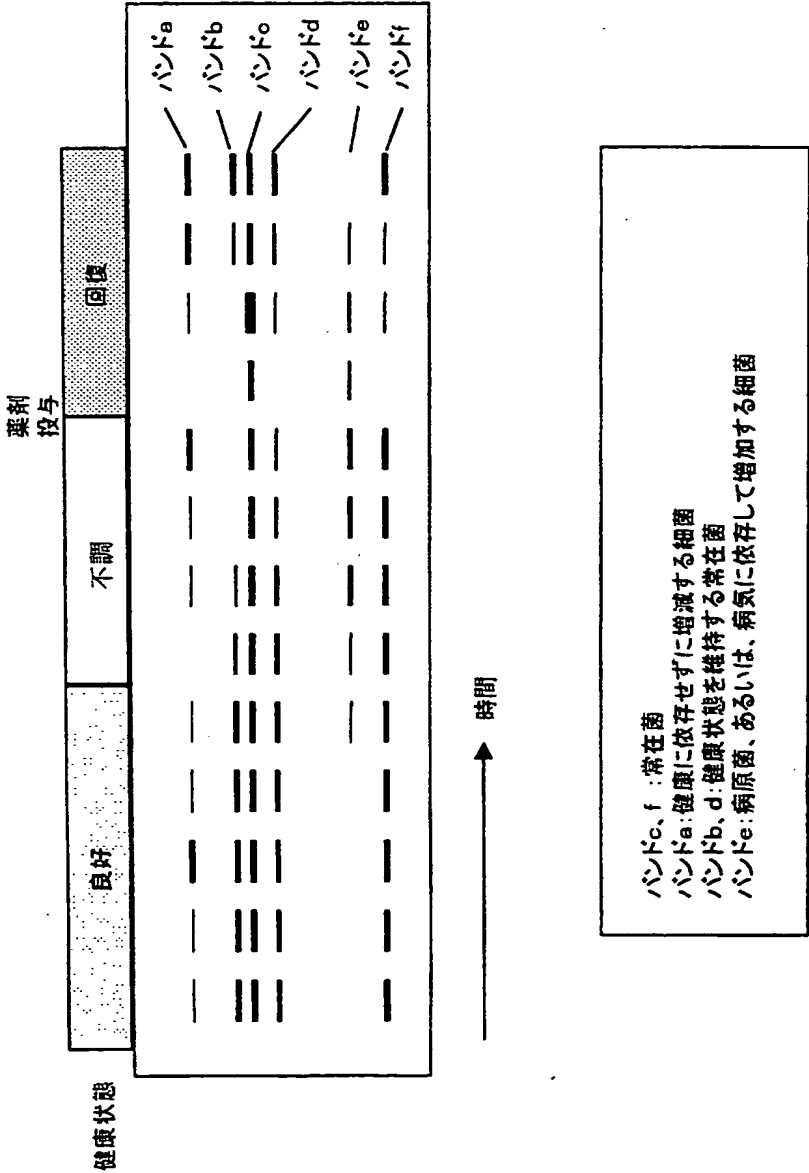
- 1 5 . 前記検出部の前段には、核酸を変性せしめるDNA変性部を設ける請求項 1 3 に記載の腸内細菌叢の分析装置。
- 5 1 6 . 前記検出部の設定温度を任意に変更できる温度制御部を備える請求項 1 3 に記載の腸内細菌叢の分析装置。

FIG. 1



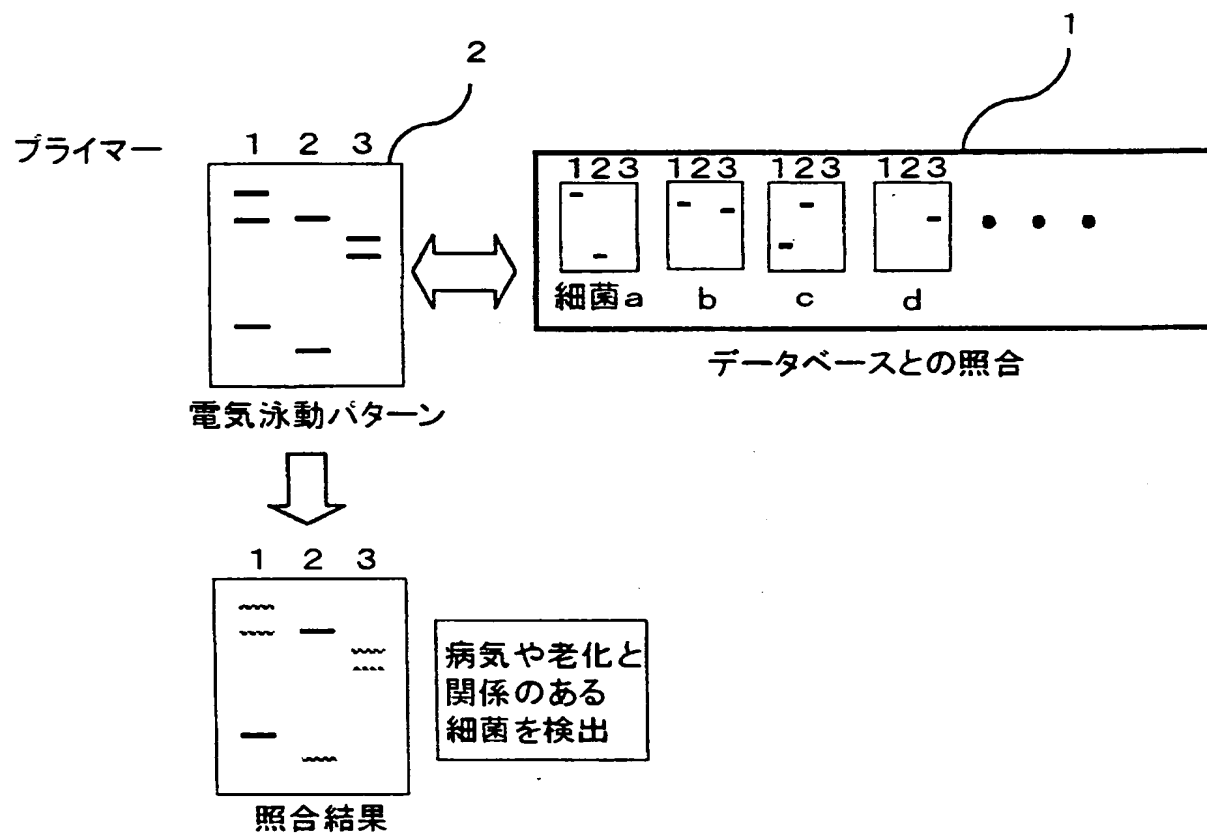
THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIG. 2



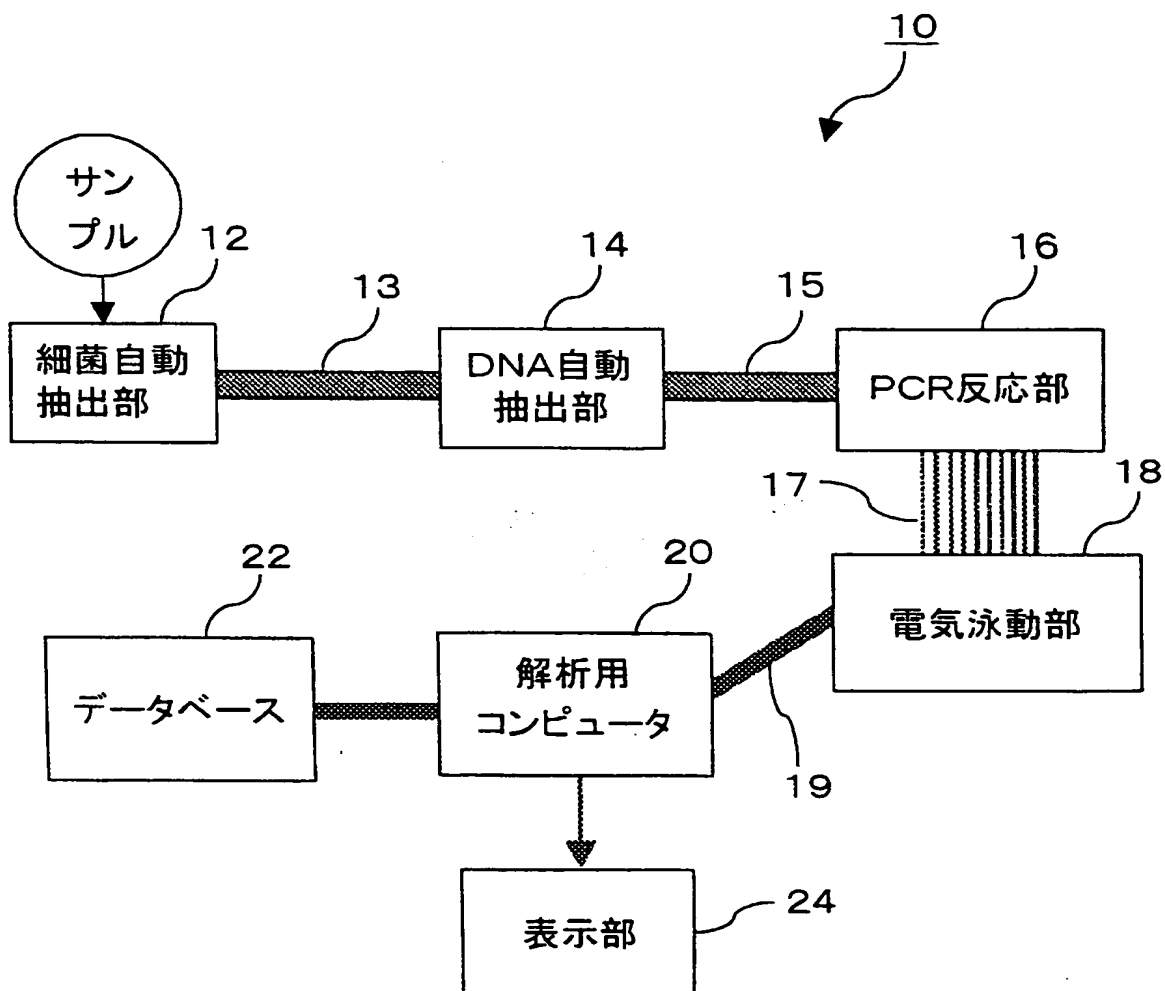
THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIG. 3



THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIG. 4



THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIG. 5

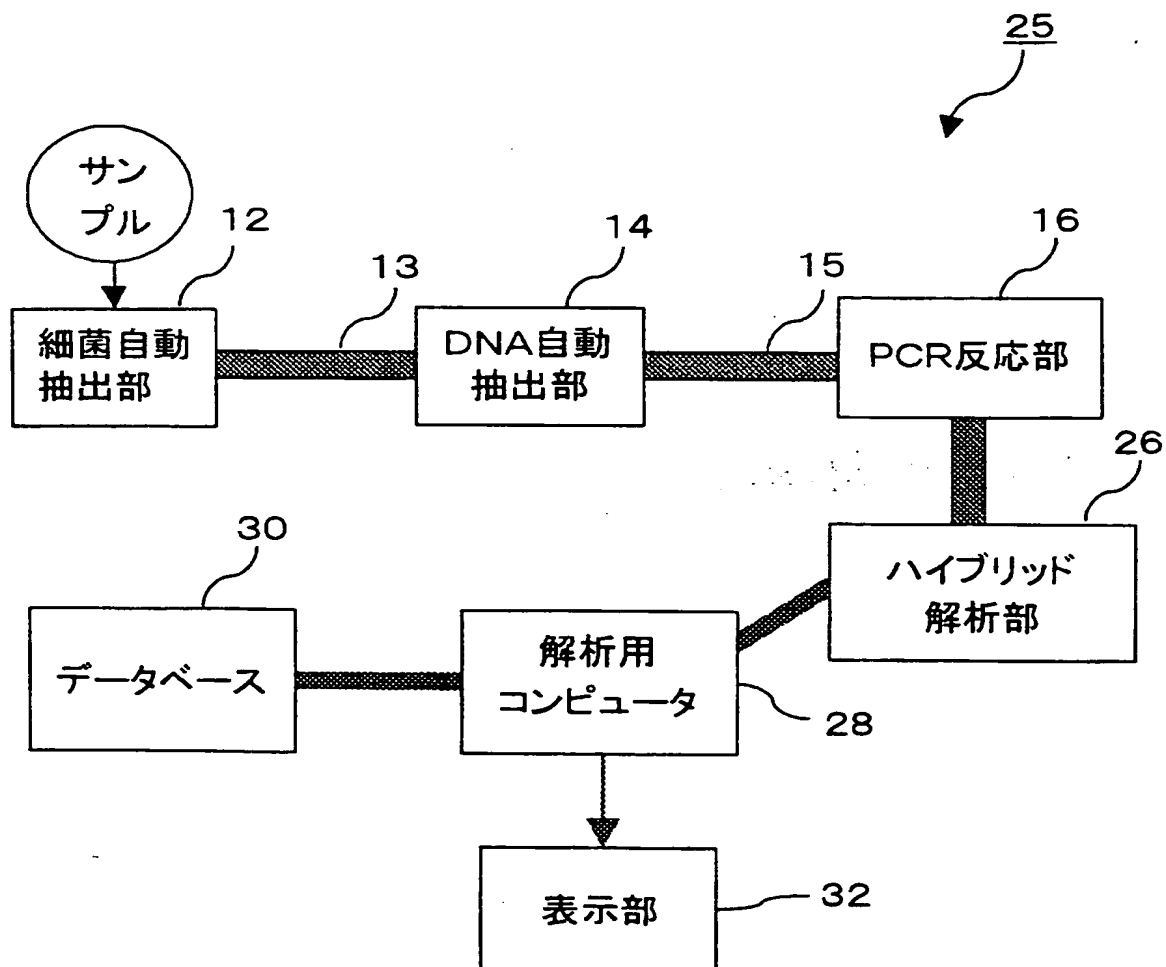
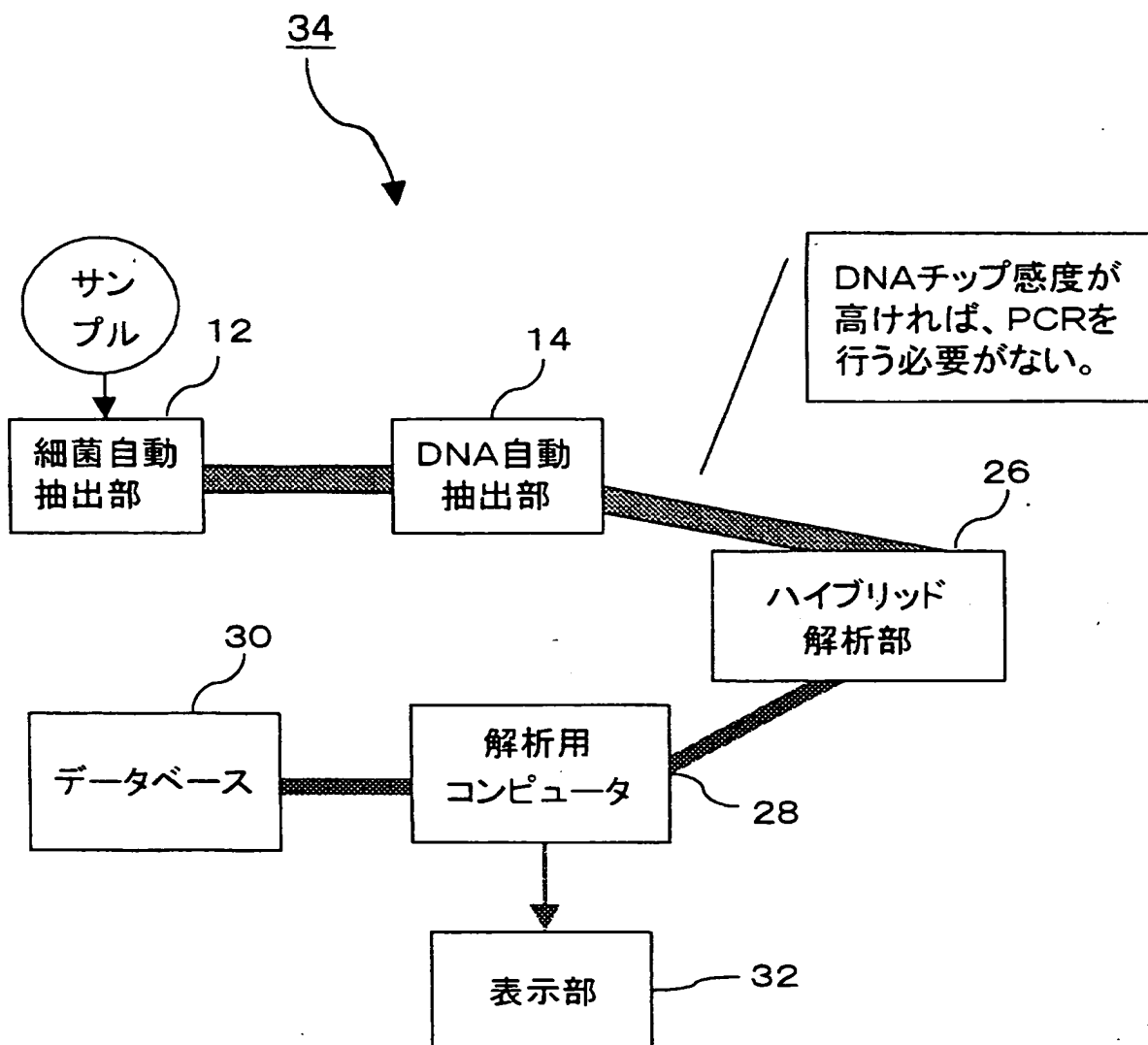


FIG. 5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

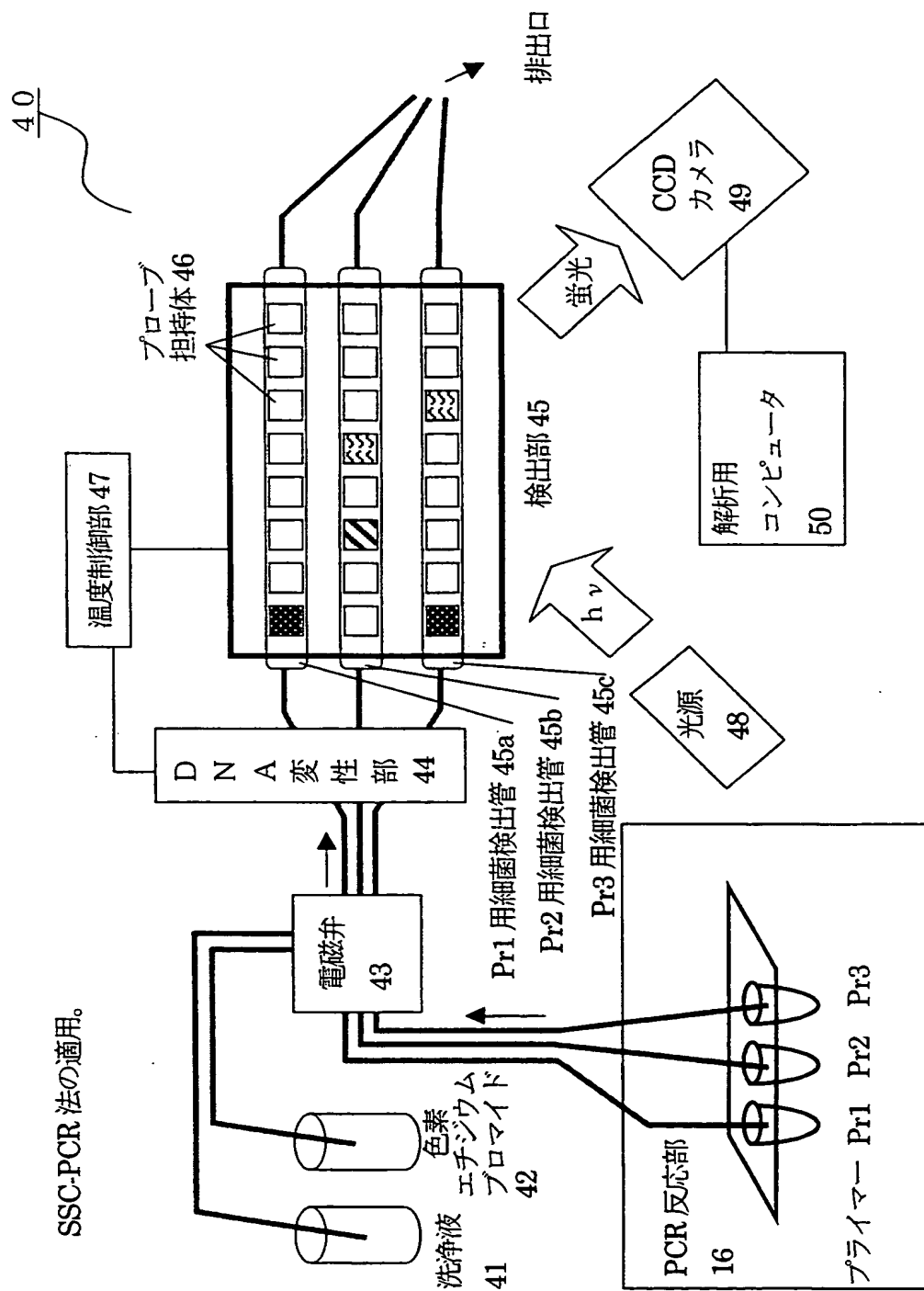
FIG. 6



THIS PAGE BLANK (USPTO)

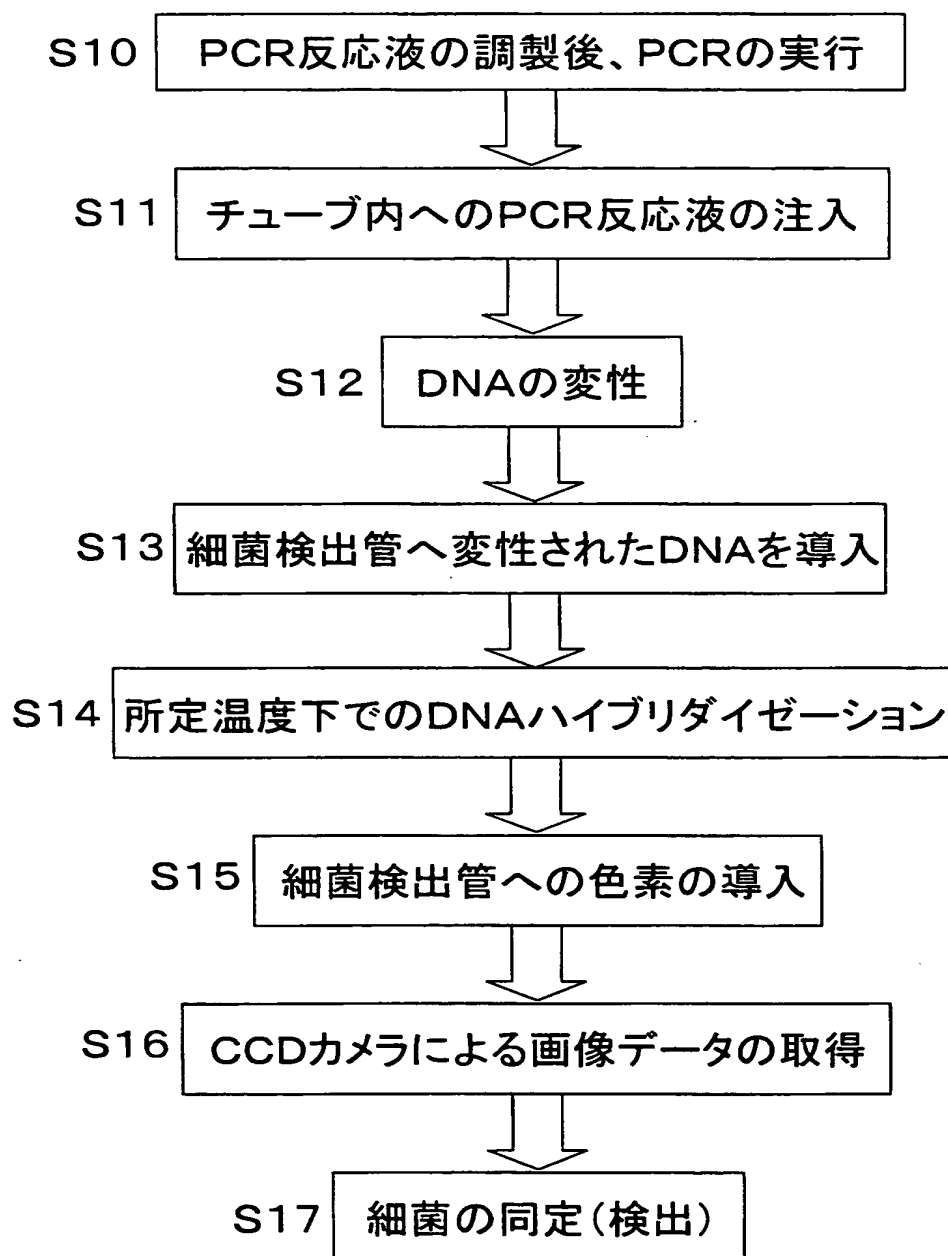
FIG. 7

SSC-PCR法の適用。



THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIG. 8



THIS PAGE BLANK (USPTO)

SEQUENCE LISTING

<110> Sanyo Electric Co., Ltd.

<120> Method of and Apparatus for Analyzing an Intestinal Flora

<130> F1000308W000

<140>

<141>

<150> JP/1999/262590

<151> 1999-09-16

<150> JP/1999/330924

<151> 1999-11-22

<160> 10

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized DNA

<400> 1

AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized DNA

<400> 2

GGCTACCTTG TTACGACTT

19

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized DNA

<400> 3

AAGGAGGTGA TCCAACCG

18

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<220>

<223> Synthesized DNA

<400> 4

AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG

20

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized DNA

<400> 5

GGCTACCTTG TTACGACTT

19

<210> 6

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized DNA

<400> 6

GCGGATCCTG CAGGAGTTTG ATCCTGGCTC AG

32

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 7

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized DNA

<400> 7

GCCTCGAGCG GCCGCTACCT TGTTACGACT T

31

<210> 8

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized DNA

<400> 8

GGCTTCGAAT CG

12

<210> 9

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<223> Synthesized DNA

<400> 9

TGGATCTTTG AC

12

<210> 10

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized DNA

<400> 10

AACATCTCCG GG

12

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05943

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12Q1/68, C12M1/00, C12M1/38, G01N33/50																							
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																							
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ C12Q1/68, C12M1/00, C12M1/38, G01N33/50																							
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																							
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI (DIALOG) , BIOSIS (DIALOG)																							
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>Day WA Dr., Pepper IL, et al.,</td> <td>1-5</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>"Use of an arbitrarily primed PCR product in the development of a Campylobacter jejuni-specific PCR." Appl Environ Microbiol (1997), Vol.63, No.3, pp.1019-1023</td> <td>6-16</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Eichner CA, Erb RW, et al., "Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community." Appl Environ Microbiol (January 1999), Vol.65, No.1, pp.102-109</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Schwieger F, Tebbe CC, "A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16s rRNA gene-based microbial community analysis." Appl Environ Microbiol (1998), Vol.64, No.12, pp.4870-4876</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>M. S. Islam, et al.,</td> <td>1-5</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>"Detection of Shigellae from Stools of Dysentery Patients by Culture and Polymerase Chain Reaction Techniques " J DIARRHOEAL DIS RES (1998), Vol.16, No.4, pp.248-251</td> <td>6-16</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	Day WA Dr., Pepper IL, et al.,	1-5	Y	"Use of an arbitrarily primed PCR product in the development of a Campylobacter jejuni-specific PCR." Appl Environ Microbiol (1997), Vol.63, No.3, pp.1019-1023	6-16	Y	Eichner CA, Erb RW, et al., "Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community." Appl Environ Microbiol (January 1999), Vol.65, No.1, pp.102-109	1-16	Y	Schwieger F, Tebbe CC, "A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16s rRNA gene-based microbial community analysis." Appl Environ Microbiol (1998), Vol.64, No.12, pp.4870-4876	1-16	X	M. S. Islam, et al.,	1-5	Y	"Detection of Shigellae from Stools of Dysentery Patients by Culture and Polymerase Chain Reaction Techniques " J DIARRHOEAL DIS RES (1998), Vol.16, No.4, pp.248-251	6-16
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																					
X	Day WA Dr., Pepper IL, et al.,	1-5																					
Y	"Use of an arbitrarily primed PCR product in the development of a Campylobacter jejuni-specific PCR." Appl Environ Microbiol (1997), Vol.63, No.3, pp.1019-1023	6-16																					
Y	Eichner CA, Erb RW, et al., "Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community." Appl Environ Microbiol (January 1999), Vol.65, No.1, pp.102-109	1-16																					
Y	Schwieger F, Tebbe CC, "A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16s rRNA gene-based microbial community analysis." Appl Environ Microbiol (1998), Vol.64, No.12, pp.4870-4876	1-16																					
X	M. S. Islam, et al.,	1-5																					
Y	"Detection of Shigellae from Stools of Dysentery Patients by Culture and Polymerase Chain Reaction Techniques " J DIARRHOEAL DIS RES (1998), Vol.16, No.4, pp.248-251	6-16																					
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																							
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																						
Date of the actual completion of the international search 27 November, 2000 (27.11.00)		Date of mailing of the international search report 05 December, 2000 (05.12.00)																					
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer																					
Facsimile No.		Telephone No.																					

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05943

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP, 11-127898, A (Yakult Bio Science Kenkyu Zaidan), 18 May, 1999 (18.05.99) (Family: none)	1-5, 8 6, 7, 9-16
X Y	JP, 11-123093, A (YAKULT HONSHA CO., LTD., Yakult Bio Science Kenkyu Zaidan), 11 May, 1999 (11.05.99) (Family: none)	1-5, 8 6, 7, 9-16
X Y	JP, 11-151097, A (YAKULT HONSHA CO., LTD.), 08 June, 1999 (08.06.99) (Family: none)	1-5, 8 6, 7, 9-16
A	JP, 11-127899, A (Yakult Bio Science Kenkyu Zaidan), 18 May, 1999 (18.05.99) (Family: none)	1-16

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/05943

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q1/68, C12M1/00, C12M1/38, G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q1/68, C12M1/00, C12M1/38, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	Day WA Dr., Pepper IL, et. al., "Use of an arbitrarily primed PCR product in the development of a Campylobacter jejuni-specific PCR." Appl Environ Microbiol (1997), Vol. 63, No. 3, p. 1019-1023	<u>1-5</u> 6-16
Y	Eichner CA, Erb RW, et. al., "Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community." Appl Environ Microbiol (1999, Jan), Vol. 65, No. 1, p. 102-109	1-16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 11. 00

国際調査報告の発送日

05.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇

4N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Schwieger F, Tebbe CC, "A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16s rRNA gene-based microbial community analysis." Appl Environ Microbiol (1998), Vol. 64, No. 12, p. 4870-4876	1-16
<u>X</u> Y	M. S. Islam, et. al., "Detection of <i>Shigellae</i> from Stools of Dysentery Patients by Culture and Polymerase Chain Reaction Techniques " J DIARRHOEAL DIS RES (1998), Vol. 16, No. 4, p. 248-251	<u>1-5</u> 6-16
<u>X</u> Y	JP, 11-127898, A (財団法人ヤクルト・バイオサイエンス研究財団) 18.5月.1999 (18.05.99) ファミリーなし	<u>1-5, 8</u> 6, 7, 9-16
<u>X</u> Y	JP, 11-123093, A (株式会社ヤクルト本社, 財団法人ヤクルト・バイオサイエン ス研究財団) 11.5月.1999 (11.05.99) ファミリーなし	<u>1-5, 8</u> 6, 7, 9-16
<u>X</u> Y	JP, 11-151097, A (株式会社ヤクルト本社) 8.6月.1999 (08.06.99) ファミリーなし	<u>1-5, 8</u> 6, 7, 9-16
A	JP, 11-127899, A (財団法人ヤクルト・バイオサイエンス研究財団) 18.5月.1999 (18.05.99) ファミリーなし	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05943

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12M1/00, C12M1/38, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12M1/00, C12M1/38, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Day WA Dr., Pepper IL, et al.,	1-5
Y	"Use of an arbitrarily primed PCR product in the development of a Campylobacter jejuni-specific PCR." Appl Environ Microbiol (1997), Vol.63, No.3, pp.1019-1023	6-16
Y	Eichner CA, Erb RW, et al., "Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community." Appl Environ Microbiol (January 1999), Vol.65, No.1, pp.102-109	1-16
Y	Schwieger F, Tebbe CC, "A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16s rRNA gene-based microbial community analysis." Appl Environ Microbiol (1998), Vol.64, No.12, pp.4870-4876	1-16
X	M. S. Islam, et al.,	1-5
Y	"Detection of Shigellae from Stools of Dysentery Patients by Culture and Polymerase Chain Reaction Techniques " J DIARRHOEAL DIS RES (1998), Vol.16, No.4, pp.248-251	6-16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
27 November, 2000 (27.11.00)

Date of mailing of the international search report
05 December, 2000 (05.12.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05943

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ✓ Y	JP, 11-127898, A (Yakult Bio Science Kenkyu Zaidan), 18 May, 1999 (18.05.99) (Family: none)	1-5, 8 6, 7, 9-16
X ✓ Y	JP, 11-123093, A (YAKULT HONSHA CO., LTD., Yakult Bio Science Kenkyu Zaidan), 11 May, 1999 (11.05.99) (Family: none)	1-5, 8 6, 7, 9-16
X ✓ Y	JP, 11-151097, A (YAKULT HONSHA CO., LTD.), 08 June, 1999 (08.06.99) (Family: none)	1-5, 8 6, 7, 9-16
A ✓	JP, 11-127899, A (Yakult Bio Science Kenkyu Zaidan), 18 May, 1999 (18.05.99) (Family: none)	1-16

THIS PAGE BLANK (USPTO)